

III. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2015 di Unit Pelaksana Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan (UPTD BIB) Tuah Sakato, Payakumbuh.

3.2. Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar sapi Bali yang ditampung langsung di Unit Pelaksana Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan (UPTD) Tuah Sakato, Payakumbuh. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sari wortel, andromeda, akuabides, larutan eosin, larutan NaCl.

Alat-alat yang digunakan adalah vagina buatan (VB) untuk menampung semen, *waterbath*, mikroskop *heater plate*, timbangan analitik, sendok spatula, gelas ukur, gelas obyek, kertas lakmus, kertas saring, *refrigator*, *erlemeyer*, *juicer*, spektrofotometer panci, aluminium foil, tissue, spuit, kertas saring, mikropipet, rak tabung reaksi, dan pelengkap lain. Penampungan semen dilakukan tiga kali.

3.3. Metode

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang akan diamati setelah dilakukan pengenceran dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan dengan rincian sebagai berikut :

- A. kontrol : 80% akuabides + 20% andromeda
- B. 80% akuabides + 15% andromeda + 5% sari wortel
- C. 80% akuabides + 10% andromeda + 10% sari wortel

D. 80% akuabides + 5% andromed + 15% sari wortel

3.4. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari persiapan bahan pengencer, penampungan semen, pengenceran semen.

3.4.1. Persiapan pengencer

Menyiapkan bahan pengencer berupa sari wortel dengan cara memilih wortel yang segar, sehat dan bersih. Dikupas wortel dan dicuci sampai bersih selanjutnya dipotong-potong kemudian diproses dengan *juicer*. Hasil proses *juicer* tersebut kemudian disaring dengan kertas saring *whatman* ukuran 125 mm sebanyak dua kali, selanjutnya masukan sari wortel kedalam gelas ukur.

3.4.2. Penampungan semen

Pelaksanaan penampungan semen dilakukan di kandang jepit dengan beralaskan karpet tebal dan pelaksanaan penampungan dilakukan pada hari Senin dan Kamis

a. Persiapan Pejantan Pemancing (*Teaser*) dan Pejantan

Kandang jepit dipersiapkan untuk pejantan yang akan ditampung semennya dan *teaser* sebagai pemancing (perangsang) seksual sebelum ditampung semennya, ternak pejantan harus dipersiapkan dengan baik. Bulu dekat *preputium* digunting, diusahakan panjangnya hanya 1,5 cm. Daerah *ventral abdomen* di sekeliling *preputium* harus bersih.

b. Melakukan *Teasing*

Pejantan yang akan ditampung semennya diusahakan menaiki *teaser*, waktu pejantan menaiki *teaser* dan penisnya harus keluar, pelaksana

penampungan (kolektor) memindahkan posisi penis pejantan tersebut dengan memegang *preputiumnya* ditarik ke arah samping atau ke arah kolektor, biarkan pejantan untuk turun lagi. Keadaan seperti diatas (*teasing*) dilakukan 3 sampai 4 kali yang diselingi semacam *exercise* dan penisnya jangan sampai menyentuh bagian belakang *teaser*, hal ini dilakukan agar tidak terjadi ejakulasi. Setelah libidonya cukup tinggi barulah dilakukan penampungan.

c. Proses Penampungan Semen

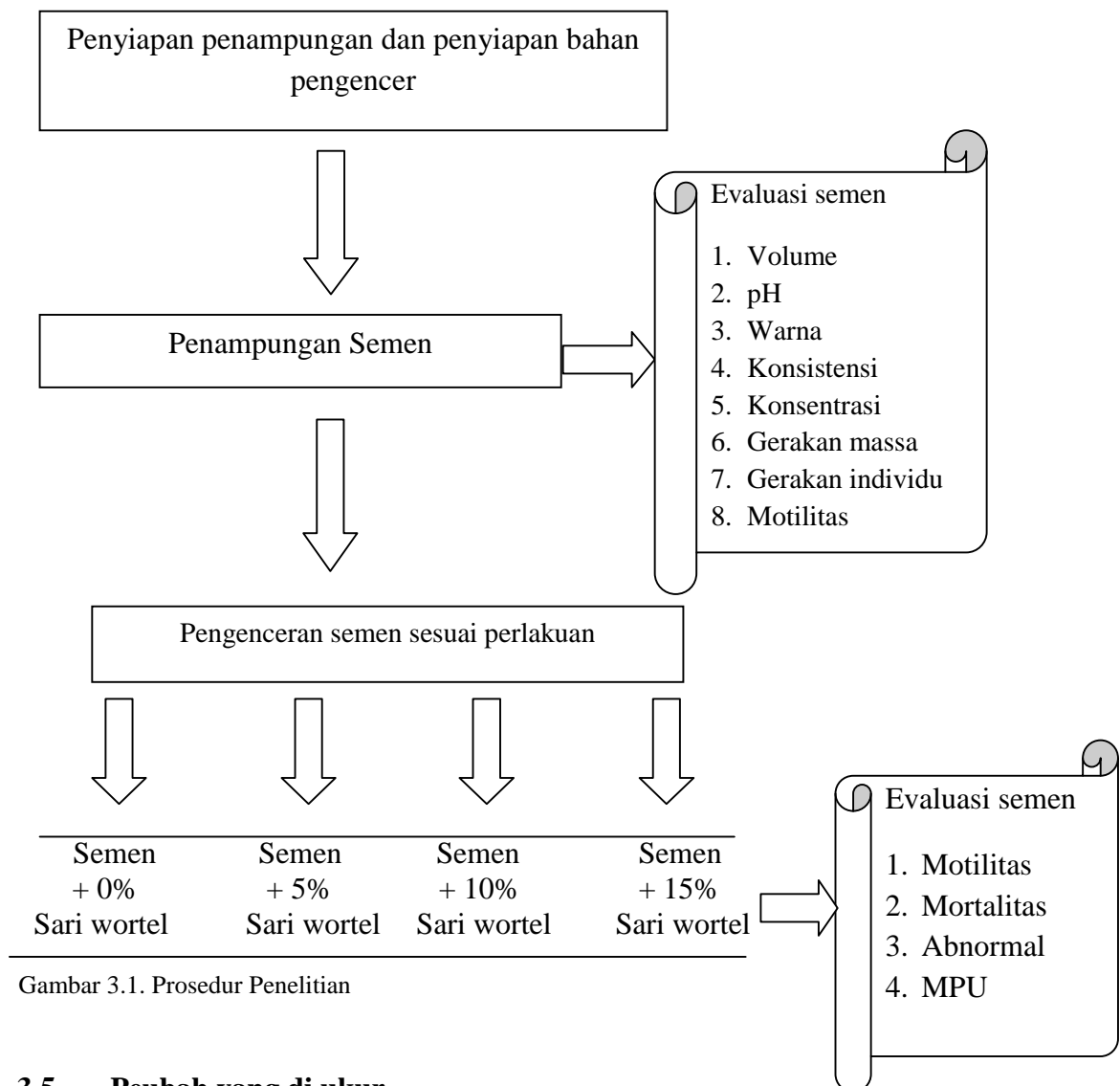
Penampungan semen menggunakan vagina buatan sebagai berikut:

- Kolektor harus dalam posisi siap menampung dengan kaki kiri sejajar kaki kanan yang telah memakai sepatu khusus (*Collecting shoes*).
- Pada waktu penis pejantan keluar sewaktu menaiki *teaser* maka kolektor memegangnya pada bagian *preputium* dan mengarahkannya ke mulut vagina buatan yang terletak di samping pantat *teaser*. Setelah ujung penis menyentuh mulut vagina buatan maka terjadilah ejakulasi dan semen ditampung,
- Semen yang telah ditampung dikirim ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan.

3.4.3. Pengenceran semen

Pengenceran sperma menggunakan andromed, akuabides dan sari wortel. Penyiapan bahan pengencer dilakukan 1–2 jam sebelum melakukan pengenceran. Rumus pengenceran :

$$\text{Jumlah pengencer} = \frac{\text{volume semen} \times \text{motilitas} \times \text{konsentrasi}}{100 \times 10^6} - \text{volume semen}$$



Gambar 3.1. Prosedur Penelitian

3.5. Peubah yang di ukur

Peubah yang diukur dalam penelitian ini meliputi:

1. Persentase motilitas.

Penentuan motilitas spermatozoa dilakukan menurut gerakan individual (Toelihere, 1993), yaitu dengan meneteskan semen pada gelas objek yang bersih dan ditutup dengan gelas penutup. Kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop *heater plate* dan layar TV pada pembesaran 45 x 10. Kemudian dihitung gerakan-gerakan individual spermatozoa.

$$\text{Motilitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa motil}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

2. Persentase Mortalitas

Penentuan persentase mortalitas spermatozoa dilakukan menurut pewarnaan differensial (Toelihere, 1993), yaitu dengan meneteskan satu tetes kecil semen yang sudah di *thawing* di atas gelas objek yang bersih kemudian ditetaskan zat warna eosin di atas semen dan dicampur secara merata dengan menggunakan satu batang gelas steril. Buat preparat ulas yang tipis segera dikeringkan di atas nyala api kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop pada pembesaran 45 x 10. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna merah, sedangkan yang masih hidup akan tetap bening. Perhitungan dilakukan sekurang-kurangnya 100 sampai 200 sel spermatozoa yang hidup dan yang mati.

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa mati}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

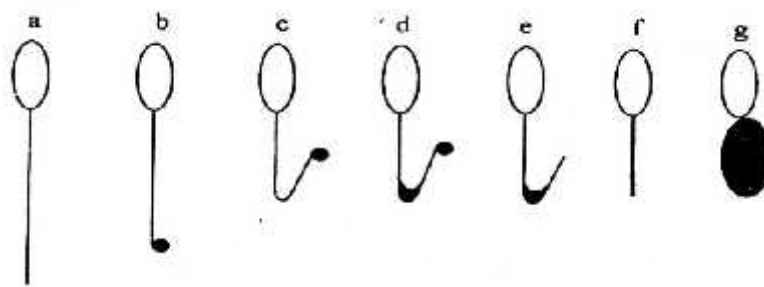
3. Persentase Abnormal

Abnormalitas spermatozoa diamati dengan membuat preparat ulas pada gelas objek dari satu tetes sperma yang dicampur dengan satu eosin. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran 45 x 10. Spermatozoa yang normal dan abnormal dihitung sampai 100 sampai 200 sel (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang morfologi abnormal dapat dihitung dengan rumus;

$$\text{Abnormal (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah spermatozoa yang normal}} \times 100\%$$

4. Persentase membran plasma utuh (MPU).

Dilakukan dengan menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test*. Prosedur yang digunakan mengikuti petunjuk Jayendra *et al.* (1984) yaitu menggunakan medium Hos Test berupa NaCl hipotonik (0.031 m; terbuat dari 0.179 g NaCl yang dilarutkan dengan 100 ml akuabides). Sebanyak 0,1 ml semen ditambah dengan 9.9 ml medium HOS Tes, selanjutnya diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C dalam water bath. Semen yang telah diinkubasi dievaluasi dengan menggunakan mikroskop cahaya 40 kali. Jumlah spermatozoa yang dihitung adalah 200 dengan skala 0 sampai 100 persen. Semen akan memperlihatkan perubahan morfologi bila diinkubasi pada medium hipotonik. Perubahan-perubahan yang terjadi antara lain dicirikan oleh pembengkakan pada ujung ekor (Gambar 3.2.b – d), lengkungan pada ekor (Gambar 3.2.c – e), ekor yang pendek dan tebal (Gambar 3.2.f) atau pembengkakan pada sebagian atau seluruh bagian dari lengkungan yang dibentuk oleh ekor spermatozoa (Gambar 3.2.d, e dan g), yang menunjukkan integritas spermatozoa yang baik.



Gambar 3.2. Skema perubahan morfologi pada spermatozoa yang diinkubasi dengan medium hipotonik; a : tidak ada perubahan; b-g: beberapa tipe perubahan pada bagian ekor (Jayendra *et al.*, 1984).

$$\text{Membran Plasma Utuh (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa dengan membran plasma utuh}}{\text{Jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh diolah menurut analisis Keragaman Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut Steel & Torrie (1993), model linier rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} : Nilai pengamatan pada perlakuan ke-I, dan ulangan ke-j

μ : Nilai tengah rata-rata

α_i : Pengaruh perlakuan ke-i

β_{ij} : Pengaruh galat dari perlakuan ke-i ulangan ke-j

Tabel 3.1. Analisis ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F Tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTP/KTG	-	-
Galat	t(r-1)	JKG	KTG	-	-	-
Total	t.r-1	JKT	-	-	-	-

Keterangan :

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{Y^2_{...}}{r.t}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} = \sum Y^2_{ij} - \text{FK}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum Y^2_j - \text{FK}}{r}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

$$\text{Kuadrat Total Perlakuan (KTP)} = \frac{\text{JKP}}{t-1}$$

$$\text{Kuadrat Total Galat (KTG)} = \frac{\text{JKG}}{n-t}$$

$$\text{F.hitung} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}}$$

Bila perlakuan berbeda nyata dilakukan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui beda antara perlakuan.